

Κείμενο διάλεξης με τίτλο «Γενετικοί προδιαθεσικοί παράγοντες στον καρκίνο του πνεύμονα» που δόθηκε την 17^η Απριλίου 2004 στα πλαίσια του 4^{ου} Συνεδρίου Κλινικής Ογκολογίας Δυτικής Ελλάδος που έλαβε χώρα στο Ρίο από 17 ως 18 Απριλίου 2004 από τον Διευθυντή του Β' Τμήματος Παθολογικής Ογκολογίας του Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «Οι Άγιοι Ανάργυροι» Γεράσιμο Ηλία Πανάγο

Τα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα συσσωρεύουν αρκετές μοριακές γενετικές και επιγενετικές βλάβες που είναι απαραίτητες για την εξαλλαγή του φυσιολογικού βρογχικού επιθηλίου σε βρογχογενή καρκίνο. Οι ποικίλες μοριακές αλλαγές που επισυμβαίνουν αλληλεπιδρούν και τελικώς οδηγούν στην κατάργηση καίριας σημασίας ρυθμιστικών των κυττάρων και ελέγχου της αύξησης διαύλων.

Στην καρκινογένεση του πνεύμονα εμπλέκονται μετά βεβαιότητας τα πρωτοογκογονίδια και τα καταπιεστικά του όγκου γονίδια (TSGs) ενώ οι ενδείξεις για εμπλοκή των γονιδίων επισκευής του DNA δεν είναι αδιαμφισβήτητες. Πολλές από τις αλλαγές των πρωτοογκογονιδίων και των TSG ανευρίσκονται τόσο στον μικροκυτταρικό όσο και στον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα· παρόλα αυτά αρκετές από τις μεταλλάξεις σχετίζονται με τον ιστολογικό τύπο.

Οι συχνότερες εμφανιζόμενες μοριακές ανωμαλίες στον καρκίνο του πνεύμονα

	Μικροκυτταρικός καρκίνος	Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος
Μικροδορυφορική αστάθεια	~35%	~22%
Αυτοκρινείς βρόχοι	GRP/GRP receptor	TGF-alpha/EGFR; Heregulin/HER2/neu
	SCF/KIT	HGF/MET
Σημειακές μεταλλάξεις του RAS	<1%	15-20%
Υπερέκφραση της οικογένειας MYC	15-30%	5-10%
Αδρανοποίηση του p53	~90%	~50%
Αδρανοποίηση του RB	~90%	15-30%
Αδρανοποίηση του p16**INK4A	0-10%	30-70%
Αδρανοποίηση του FHIT	~75%	~50-75%
Συχνή απώλεια αλλήλων	3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 13q, 17p, 22q	3p, 6q, 8p, 9p, 13p, 17p, 19q
Δραστηριότητα τελομεράσης	~100%	80-85%
Έκφραση του BCL2	75-95%	10-35%

EGFR, epidermal growth factor receptor; FHIT, fragile histidine triad; GRP, gastrin-releasing peptide; HGF, hepatocyte growth factor; RB, retinoblastoma protein; SCF, stem cell factor; TGF-alpha, transforming growth factor-alpha.

Τα πρωτοογκογονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ασκούν προαγωγική δράση επί του μεταλλαγμένου φαινοτύπου και για λόγους απλότητας μπορούν να θεωρούνται θετικοί ρυθμιστές της αύξησης. Η ενεργοποίησή τους οδηγεί στην λειτουργική τους απορύθμιση καταλήγει σε διόγκωση της λειτουργίας ή του επικρατούντος αποτελέσματος. Αντίστροφα, τα προϊόντα των TSG είναι αρνητικοί ρυθμιστές της αύξησης και η αδρανοποίησή τους οδηγεί σε απώλεια λειτουργιών που συνεισφέρει στην ανάπτυξη της κακοήθειας.

Τα βασικά αυτά μοριακά συμβάματα αντιδρώντας και με άλλες βιολογικές μεταβολές συνιστούν τα χαρακτηριστικά της δυσρυθμισμένης αύξησης, της κλωνικής εξάπλωσης και της αθανασίας που ταυτοποιούν τον προφανή καρκίνο του πνεύμονα. Οι βλάβες αυτές καθώς και άλλες που δεν έχουν ακόμη ιχνηλατηθεί επηρεάζουν επίσης την διήθηση, την μετάσταση και την αντίσταση στην αντικαρκινική θεραπεία.

Για να μεταφέρουμε τις εργαστηριακές αυτές παρατηρήσεις/ανακαλύψεις στην κλινική πράξη είναι σημαντικό να προσδιορίσουμε την συχνότητα εμφάνισης των εν λόγω βλαβών καθώς και να προσδιορίσουμε την κλινική τους σημασία (συσχέτιση με ιστολογικό τύπο, στάδιο, επιβίωση, ανταπόκριση στη θεραπεία), την σημασία τους για την πρόληψη και την πρώιμη διάγνωση, καθώς και την σημασία τους στην παρακολούθηση των θεραπευτικών προσπαθειών και την αναζήτηση νέων θεραπειών.

Χρωμοσωμιακές ανωμαλίες

Στον καρκίνο του πνεύμονα εμφανίζονται αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδία) που συνοδεύονται από απώλεια ή περίσσεια αλλήλων και δομικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Στις τελευταίες περιλαμβάνονται αναντίστοιχες μεταθέσεις και διαγραφές ενώ η παρουσία διπλών λεπτών και ομογενώς κεχρωσμένων περιοχών είναι ενδεικτικές γονιδιακής μεγέθυνσης όπως αυτό συμβαίνει στην οικογένεια γονιδίων MYC (1). Οι απώλειες στα χρωμοσώματα 3p, 5q, 13q, and 17p κυριαρχούν στον μικροκυτταρικό καρκίνο του

πνεύμονα ενώ οι διπλές λεπτές περιοχές είναι συνήθεις στην προκεχωρημένη νόσο. Στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο είναι συνήθεις οι απώλειες γενετικής ύλης των χρωμοσωμάτων 3p, 9p, and 17p, και +7, i(5)(p10), and i(8)(q10). Η μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση με τον συγκριτικό γονιδιακό υβριδισμό έχουν αναγνωρίσει ανωμαλίες που περιλαμβάνουν απώλειες στα χρωμοσώματα 10q26, 16p11.2, and 22q12.1-13.1 και μεγέθυνση στα 1q24, 3q, 5p, 17q, και Xq26. Σήμερα πιστεύεται ότι οι όγκοι του ανθρώπου είναι γενετικά ασταθείς τόσο σε χρωμοσωμιακό επίπεδο (απώλειες και μεγεθύνσεις) όσο και στο επίπεδο των νουκλεοτιδίων του DNA (μονήρεις ή πολλαπλές αλλαγές βάσεων) (2). Παραμένει να προσδιορισθεί αν η ανευπλοειδία και οι δομικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες συνιστούν το φαινόμενο της χρωμοσωμιακής αστάθειας στον καρκίνο του πνεύμονα.

Μικροδορυφορική αστάθεια

Η γενετική βλάβη που εκδηλώνεται ως μεταλλάσων φαινότυπος και συχνά αποκαλείται φαινότυπος αποκατάστασης λάθους αντιγραφής στους καρκίνους του ανθρώπου οδηγεί σε εκτεταμένη μικροδορυφορική αστάθεια. Το φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας συνίσταται σε κλίμακα από βραχείας έκτασης επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA σε πολλαπλούς επιτόπους που παρατηρείται σε ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης υψηλής ανάλυσης. Ο φαινότυπος συνήθως οφείλεται σε αδρανοποίηση εκ μετάλλαξης των ενζύμων αποκατάστασης του κακοταϊριάσματος του DNA που καταλήγει σε εκσεσημασμένη αστάθεια των πολυμορφικών αυτών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του DNA.

Στον καρκίνο του πνεύμονα εμφανίζεται συχνά μικροδορυφορική αστάθεια που αφορά σε λίγους επιτόπους και εκδηλώνεται με μεταθέσεις μεμονωμένων ταινιών αλλήλων σε σύγκριση με το φυσιολογικό DNA του ίδιου αρρώστου. Το γονίδιο της γλυκοσυλάσης της 8-οξογουανίνης του DNA (8-oxoguanine DNA glycosylase - hOGG1) που ενέχεται στην επισκευή των οξειδωτικών βλαβών του DNA στον άνθρωπο αν και εμφανίζεται σπάνια πιθανολογείται ότι σχετίζεται με τις πολλαπλές μεταλλάξεις στον καρκίνο του πνεύμονα. Η συνολική εμφάνιση μικροδορυφορικών μετατροπές σε μεμονωμένους επιτόπους εμφανίζεται στο 35% των μικροκυτταρικών και στο 22% των μη-μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα (3).

Στον καρκίνο του πνεύμονα οι μικροδορυφορικές μετατροπές σχετίζονται με μικρή ηλικία, μικρή επιβίωση, και προχωρημένο στάδιο της νόσου καθώς και ερευνάται η σημασία της ανεύρεσής τους στα πτύελα, το αίμα και τα βρογχικά εκπλύματα για την πρώιμη διάγνωση.

Παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA αφορά σε ομοιοπολική τροποποίηση στην θέση του 5^{ου} άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης των CpG νουκλεοτιδίων του DNA, τα οποία έχουν την τάση να σχηματίζουν συστάδες γύρω από τα 5' τελικά τμήματα πολλών γονιδίων (CpG islands). Η υπερμεθυλίωση της προαγωγικής περιοχής 5' των γονιδίων σχετίζεται με μεταγραφική σιγή και αποτελεί εναλλακτικό μηχανισμό υπορύθμισης (down-regulating) της έκφρασης του TSG παρά διαγραφής γονιδίων ή μετάλλαξης. Η υπερμεθυλίωση της προαγωγικής περιοχής του γονιδίου p16^{**}INK4A σε υποσύνολο των μη μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα οδηγεί στην υπορύθμισή του και μπορεί να αποτελεί πρώιμο γεγονός στην παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα (4). Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι και άλλα γονίδια υφίστανται παρεκκλίνουσα μεθυλίωση των προαγωγικών τους περιοχών στον καρκίνο του πνεύμονα ενώ οι βλάβες αυτές δεν ανευρίσκονται στον περιβάλλοντα φυσιολογικό πνευμονικό ιστό. Μεταξύ των γονιδίων αυτών περιλαμβάνονται η σχετιζόμενη με τον θάνατο πρωτεϊνική κινάση (DAP [death associated protein] kinase), η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GSTP1 - glutathione S-transferase), και η μεθυλτρανσφεράση της O^{**}6-μεθυλγουανίνης του DNA (MGMT - O^{**}6-methylguanine-DNA-methyltransferase) (5). Επιπρόσθετα, DNA που περιέχει τις μεθυλιωμένες αυτές αλληλουχίες ανιχνεύεται σε δείγματα αίματος αποδεικνύοντας ότι τα καρκινικά κύτταρα εκχέουν DNA στο περιφερικό αίμα. Έτσι, αλληλουχίες DNA με παρεκκλίνουσα μεθυλίωση που ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στην πρώιμη διάγνωση. Στην παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα εμπλέκεται και η υπερμεθυλίωση άλλων περιοχών όπως των 3p, 4q34, 10q26, and 17p13.

Πέραν της χρησιμότητος στην πρώιμη διάγνωση, ενδέχεται το εύρημα της υπερμεθυλίωσης να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και θεραπευτικά αν καταστεί δυνατή η αναστροφή της φαρμακολογικά. Σε κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιείται ο απομεθυλιωτικός παράγοντας 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (5-aza-2'-deoxycytidine). Κλινικές μελέτες με απομεθυλιωτικούς παράγοντες στον καρκίνο του πνεύμονα δεν έχουν σχεδιαστεί και υλοποιηθεί ακόμη. Στον καρκίνο του πνεύμονα παρατηρείται επίσης απώλεια της αποτύπωσης, που χρησιμοποιεί ως μέσον την μεθυλίωση και επιτρέπει την έκφραση των γονιδίων. Στον καρκίνο του πνεύμονα εμφανίζεται απώλεια αποτύπωσης του γονιδίου του αυξητικού παράγοντα-2 που προσομοιάζει προς την ινσουλίνη (insulin-like growth factor-2 - IGF-2) και του γονιδίου H19 που σχετίζεται με την υπομεθυλίωση της προαγωγικής του περιοχής.

Πρωτοογκογονίδια και διέγερση της αύξησης

Η ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων απαιτεί μηχανισμούς όπως γονιδιακή μεγέθυνση ή σημειακές μεταλλάξεις μονήρους αλλήλου που οδηγεί σε σημαντική υπερέκφρασή του. Στα προϊόντα των πρωτοογκογονιδίων περιλαμβάνονται αρκετοί υποδοχείς αυξητικών παραγόντων όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor - EGFR), το ERBB2, το KIT, και το MET, οι οποίοι εκφράζονται από

τα νεοπλασματικά κύτταρα ή από τα γειτονικά τους φυσιολογικά κύτταρα και υπηρετούν αυτοκρινείς ή παρακρινείς βρόχους ρύθμισης της αύξησης.

Η υπερέκφραση του EGFR που κωδικοποιείται από το γονίδιο ERBB1 είναι συχνότερη στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα παρότι στο μικροκυτταρικό και σχετίζεται με το στάδιο της νόσου και τον βαθμό διαφοροποίησης. Η συνέκφραση του EGFR και του συνδεδεμένου με αυτόν μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα άλφα (transforming growth factor-alpha - TGF-alpha) από τα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα καταδεικνύει την παρουσία αυτοκρινούς βρόχου. Στο 70% των περιπτώσεων μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα εμφανίζεται υπερέκφραση του EGFR ενώ σύγχρονη υπερέκφραση του EGFR και του TGF-alpha εμφανίζεται στο 38% των περιπτώσεων (6). Η παρουσία του βρόχου αυτού δεν έχει κλινικά σημαντική συσχέτιση με την συνολική επιβίωση στα πρώιμα στάδια του μη μικροκυτταρικού καρκίνου και φαίνεται ότι παίζει ρόλο στην ογκογένεση του καρκίνου του πνεύμονα και όχι στην πρόοδο της νόσου (6). Στο 35% των μη μικροκυτταρικών καρκίνων, και ειδικότερα στα αδενοκαρκινώματα, το ERBB2 (HER2/neu) εμφανίζει υψηλό επίπεδο έκφρασης και θεωρείται ότι αποτελεί εσωτερικό δείκτη πολυφαρμακευτικής αντίστασης σε κυτταρικές σειρές (7). Στα κύτταρα του μικροκυτταρικού καρκίνου εκφράζονται κατά προτίμηση το KIT και ο συνδεδεμένος με αυτό παράγων των στελεχιαίων κυττάρων (stem cell factor - SCF). Πιθανολογείται ότι η ενεργοποίηση του αυτοκρινούς αυτού βρόχου παρέχει αυξητικό πλεονέκτημα στα νεοπλασματικά κύτταρα. Η οδός μορφομετατροπής σήματος του SCF/KIT σχετίζεται με το Lck, μια τυροσινική κινάση σχετιζόμενη με τον src (8). Το MET και ο συνδεδεμένος με αυτό ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (hepatocyte growth factor - HGF) εμπλέκονται στην ανάπτυξη του εμβρυϊκού πνεύμονα. Η συνέκφραση του βρόχου αυτού παρατηρείται στις περισσότερες περιπτώσεις μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και υψηλά επίπεδα HGF σχετίζονται με κακή πρόγνωση σε αρρώστους με εξαιρεσιμό μη μικροκυτταρικό καρκίνο (9).

Στον καρκίνο του πνεύμονα, πέραν των προϊόντων των πρωτοογκογονιδίων, ανευρίσκονται και άλλοι διεγερτικοί της αύξησης βρόχοι. Ο καλλίτερα μελετημένος εξ αυτών είναι εκείνος που κατευθύνεται από το πεπτιδίο που απελευθερώνει την γαστρίνη (gastrin-releasing peptide - GRP) και άλλα προσομοιάζοντα προς την bombesin πεπτιδία και οι υποδοχείς τους που συμμετέχουν στην ανάπτυξη και την επιδιόρθωση του πνεύμονα και την προαγωγή της αύξησης του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα μέσω αυτοκρινούς βρόχου.

Η οικογένεια γονιδίων RAS (KRAS, HRAS, and NRAS) ενεργοποιείται με σημειακές μεταλλάξεις στους κώδωνες 12, 13, ή 61, και στο 20% ως 30% των περιπτώσεων μη μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (ιδιαίτερα στα αδενοκαρκινώματα) ανευρίσκεται μετάλλαξη σε ένα μέλος της οικογένειας (10), ενώ τέτοια μετάλλαξη δεν παρατηρείται στα μικροκυτταρικά καρκινώματα. Στα αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα το KRAS αποτελεί το 90% μεταλλάξεων του RAS. Αξίζει να τονισθεί η συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του KRAS με την κατανάλωση τσιγάρων που καταδεικνύει τον αιτιολογικό συσχετισμό καπνίσματος και καρκίνου του πνεύμονα.

Μεγέθυνση των γονιδίων της οικογένειας MYC έχει παρατηρηθεί σε διάφορο βαθμό στους κύριους υποτύπους καρκίνου του πνεύμονα. Στον SCLC ένα μέλος της οικογένειας MYC μεγεθύνεται στο 18% των όγκων και το 31% των κυτταρικών σειρών, σε αντίθεση με το 8% των μη μικροκυτταρικών καρκίνων και το 20% κυτταρικών σειρών αντίστοιχα (10). Μεγέθυνση εμφανίζεται συχνότερα σε αρρώστους που έχουν ήδη πάρει χημειοθεραπεία, και η παρουσία της σχετίζεται αντίστροφα με την επιβίωση.

Δίαυλος του p53

Το p53 (ή TP53) διατηρεί την ακεραιότητα του γενώματος σε κατάσταση κυτταρικού stress που οφείλεται σε βλάβη του DNA όπως το προκαλούμενο από ακτινοβολία γ, υπεριώδη ακτινοβολία, καρκινογόνα ή χημειοθεραπευτικά. Λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγων για την ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων που ελέγχουν σημεία αναφοράς του κυτταρικού κύκλου (π.χ. το p21**WAF1/CIP1), την απόπτωση (BAX), την επισκευή του DNA (GAD-D45), και την αγγειογένεση (thrombospondin). Το γονίδιο p53 είναι το συχνότερα μεταλασσόμενο TSG στις κακοήθειες του ανθρώπου, και οι μεταλλάξεις του εμφανίζονται στο 90% των μικροκυτταρικών και το 50% των μη μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα (11, 12). Οι περισσότερες μεταλλάξεις εμφανίζονται στα εξελικτικά διατηρημένα εξόνια 5 ως 8 του p53. Στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα οι αλλαγές του p53 εμφανίζονται συχνότερα στο επιδερμογενές (51.2%) και το μεγαλοκυτταρικό (53.7%) και λιγότερο συχνά στο αδενοκαρκίνωμα (38.8%) (12). Οι μεταλλάξεις του p53 συσχετίζονται με το κάπνισμα των τσιγάρων και οι περισσότερες είναι του τύπου εγκαρσίων μεταθέσεων G προς T όπως αναμένεται από την δράση των καρκινογόνων του καπνού (13). Οι μεταλλάξεις του p53 περιλαμβάνουν ανωμαλίες στην παραγωγή (dyssense), ανωμαλίες μη παραγωγής (non-sense), ανωμαλίες προσαρμογής καθώς και μεγαλύτερες διαγραφές. Οι μεταλλάξεις των νοηματικών εκκινήτων (sense) που αποτελούν και το συχνότερο τύπο μεταλλάξεων επιμηκύνουν τον χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης p53 σε αρκετές ώρες και οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα σε τρόπο ώστε να ανιχνεύεται και με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους (14). Το γεγονός ότι το 15% των αρρώστων με καρκίνο του πνεύμονα αναπτύσσουν αντισώματα στην πρωτεΐνη p53 υποδηλώνει ότι η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53 μπορεί να οδηγήσει σε χυμική άνοση απάντηση. Αν και έχει θεωρηθεί ότι η παρουσία αντισωμάτων στο p53 αποτελεί δείκτη πρώιμης διάγνωσης (15) και χημειοευαισθησίας (16) η ανάπτυξη των αντισωμάτων αυτών δεν φαίνεται να βελτιώνει την πρόγνωση στον καρκίνο του πνεύμονα (17).

Κυκλίνη D1 και Εξαρτώμενη από την Κυκλίνη Κινάση-4

Το σύμπλεγμα κυκλίνης D1/CDK4 αναστέλλει τη δραστηριότητα του RB (γονίδιο του ρετινοβλαστώματος) ενεργοποιώντας την φωσφορullίωσή του και κατ' αυτό τον τρόπο η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 ή CDK4 αποτελεί εναλλακτική οδό για την διάρρηξη του διαύλου. Υπερέκφραση της κυκλίνης D1 ανευρίσκεται ανοσοϊστοχημικά στο 12% ως 47% των πρωτοπαθών μη μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα και σε αρκετές περιπτώσεις η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 σχετίζεται με κακή πρόγνωση (18).

Πρωτεΐνη Ρετινοβλαστώματος (RP)

Το γονίδιο της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (RB) εντοπίζεται στην χρωμοσωμιακή περιοχή 13q14, και κωδικοποιεί μια καταπιεστική της αύξησης πυρηνική φωσφοροπρωτεΐνη. Όταν η RB είναι ενεργός συνδέεται με πρωτεΐνες, όπως ο παράγων μεταγραφής E2F-1 που είναι απαραίτητος για την μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, τους οποίους και αδρανοποιεί. Έχει αποδειχθεί ότι στον καρκίνο του πνεύμονα ανευρίσκονται μεταλλάξεις του RB (περικοπή δια διαγραφής, μεταλλάξεις μη γηράνσεως, ανωμαλίες συναρμογής) καθώς και απώλεια του φυσικού αλλήλου του RB. Η πρωτεΐνη του RB απουσιάζει ή είναι δομικά ανώμαλη σε περισσότερο του 90% των μικροκυτταρικών καρκινωμάτων και στο 15% ως 30% των μη μικροκυτταρικών (19). Η απουσία έκφρασης του RB σχετίζεται με κακή πρόγνωση στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο. Η σχετικά χαμηλή συχνότητα ανεύρεσης ανωμαλιών του RB στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο είναι συμβατή με την συχνή αποδιοργάνωση του διαύλου p16**INK4A-cyclin D1-CDK4-RB. Αξίζει να μνημονευθεί ότι άρρωστοι με ρετινοβλάστωμα, και οι συγγενείς τους, που φέρουν μεταλλαγμένο RB γονίδιο διατρέχουν πολύ υψηλό κίνδυνο να εμφανίσουν μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα στην ενήλικη ζωή (20).

Δραστηριότητα Τελομεράσης

Κατά την φυσιολογική κυτταρική διαίρεση η βράχυνση των τελομερών οδηγεί στην γήρανση των κυττάρων ρυθμίζοντας την θνητότητα των φυσιολογικών κυττάρων. Στα φυσιολογικά στελεχιαία κύτταρα (stem cells) τα τελομερή διατηρούνται δια του ενζύμου τελομεράση. Η παθολογική της έκφραση στους όγκους έχει κριτικό ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου. Υψηλά επίπεδα δραστηριότητας τελομεράσης έχουν ανευρεθεί στο 100% των μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα και το 80-85% των μη μικροκυτταρικών. Το υψηλό επίπεδο δραστηριότητας της τελομεράσης σχετίζεται με αυξημένο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και προχωρημένο στάδιο στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (21). Εφόσον αποδειχθεί ότι υπάρχουν αληθώς αρνητικοί στην τελομεράση μη μικροκυτταρικοί καρκίνοι του πνεύμονα θα πρέπει να θεραπεύονται με κυτταρομειωτική χειρουργική (debulking) και ακτινοθεραπεία ακόμη και για την αντιμετώπιση της μεταστατικής νόσου μιας και οι όγκοι αυτοί προβλέπεται ότι θα γηράσουν όταν τα τελομερή τους βραχυνθούν αρκετά. Η δραστηριότητα της τελομεράσης και η έκφραση του αντίστοιχου RNA είναι επίσης δυσρυθμισμένα στο καρκίνωμα in situ που σχετίζεται με τον καρκίνο του πνεύμονα καταδεικνύοντας ότι η δραστηριοποίηση της τελομεράσης στον καρκίνο του πνεύμονα συμβαίνει στο προκαρκινικό στάδιο κατά την καρκινογένεση (22).

Απόπτωση

Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν αποκτήσει την ικανότητα να διαφεύγουν από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), που συνήθως εμφανίζεται υπό αντίξοες συνθήκες όπως επί βλάβης του DNA. Στα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα εμφανίζονται ανωμαλίες και σε άλλα, πέραν του p53, μόρια του συμπλέγματος που σηματοδοτεί τους αποπτωτικούς διαύλους όπως το αντιαποπτωτικό γονίδιο BCL2 που υπερεκφράζεται ανώμαλα στον μικροκυτταρικό (75% ως 95%) και εν μέρει στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (στο 25% ως 35% των επιδερμογενών καρκινωμάτων και στο 10% περίπου των αδενοκαρκινωμάτων). Επίσης, πρωτεΐνες της μεσοκυτταρίου ουσίας μπορεί να προστατεύουν τον SCLC από την μέσω της χημειοθεραπείας προκαλούμενη απόπτωση δια της ενεργοποίησης της τυροσινικής κινάσης που διεγείρεται από την βήτα(1)-ιντεγκρίνη (beta(1)-integrin) (23). Επιπρόσθετα, στον καρκίνο του πνεύμονα εμπλέκονται το Fas (CD95) και το συνδεδεμένο με αυτό FasL που διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην εκκίνηση ενός των αποπτωτικών διαύλων (24).

Μετάσταση και αγγειογένεση

Στον πρωτοπαθή καρκίνο του πνεύμονα έχουν μελετηθεί αρκετοί παράγοντες, και κύρια τα μόρια προσκόλλησης των κυττάρων, που δύνανται να επηρεάζουν την μεταστατικότητα του όγκου. Η μειωμένη έκφραση της E-cadherin προκαλείται από υπερμεθυλίωση του προαγωγού και σχετίζεται με την κυτταρική διαφοροποίηση, αυξημένη μεταστατικότητα στους λεμφαδένες και χαμηλή επιβίωση σε αρρώστους με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (25). Η μειωμένη έκφραση της άλφα(3)-ιντεγκρίνης (alpha(3)-integrin) σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση σε αρρώστους με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (26). Ειδικά ισόμορφα του CD44 σχετίζονται με την μεταστατικότητα του καρκίνου του πνεύμονα. Επίσης, οι μεταλ-λοπρωτεΐνάσες της μεσοκυτταρίου ουσίας ενέχονται στην διηθητικότητα του καρκίνου του πνεύμονα μέσω της αποσάθρωσης του στρώματος που προκαλούν. Στο 50% των μικροκυτταρικών και το 65% των μη μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα παρατηρείται έκφραση της Ζελατινάσης A (Gelatinase A), ενώ σε στοιχεία του στρώματος του μη μικροκυτταρικού καρκίνου ανιχνεύθηκε

υπερέκφραση της στρωμελυσίνης-3 (stromelysin-3). Στην πρόοδο των όγκων του πνεύμονα και την μεταστατικότητα του ενέχονται και άλλα γονίδια που δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί όπως αποδεικνύεται από την παρατηρούμενη απώλεια αλληλών στα 2q, 9p, 18q, και 22q στις εγκεφαλικές μεταστάσεις σε αντίθεση με τον πρωτοπαθή μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα στον ίδιο άρρωστο (27).

Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη για να μπορέσει να αυξηθεί η μάζα ενός όγκου πέρα από τα πρώτα λίγα χιλιοστά. Σήμερα πιστεύεται ότι η αγγειογένεση ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ προαγωγών και αναστολέων που εκκρίνονται τόσο από τα νεοπλασματικά όσο και από τα φυσιολογικά κύτταρα του ξενιστή. Ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων (vascular endothelial growth factor - VEGF) και ο βασικός αυξητικός παράγων των ινοβλαστών αποτελούν τους κύριους προαγωγούς της αγγειογένεσης που παράγονται από τα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα στον άνθρωπο (28). Στην ανάπτυξη του καρκίνου πνεύμονα εμπλέκονται και αγγειογενετικές χημειοκίνες όπως η Ιντερλευκίνη-8. Οι μεταλλάξεις του p53 οδηγούν σε μειωμένη έκφραση της θρομβοσπονδίνης (thrombospondin) που είναι αρνητικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης. Στον καρκίνο του πνεύμονα παράγεται περίσσεια διεγερτικών της αγγειογένεσης παραγόντων ενώ παράλληλα σταματά η παραγωγή αναστολέων της.

Τα καρκινογόνα του καπνού και η γενετική προδιάθεση στον καρκίνο του πνεύμονα (γενετική επιδημιολογία)

Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει καρκινογόνα, συν-καρκινογόνα και προαγωγούς των όγκων. Είκοσι από τα καρκινογόνα του καπνού είναι αποδεδειγμένο ότι προκαλούν όγκους στους πνεύμονες των πειραματοζώων και τον άνθρωπο (29). Η καρκινογενετική δράση του καπνού του τσιγάρου εκδηλώνεται με την ενεργοποίηση και αδρανοποίηση ενζύμων όπως και με τον σχηματισμό ομοιοπολικών συμπλόκων του DNA που οδηγούν σε ελλειμματική αντιγραφή του DNA και μετάλλαξη. Σύμπλοκα του DNA έχουν αναγνωρισθεί στον βρογχικό ιστό αρρώστων με καρκίνο του πνεύμονα και το επίπεδο των συμπλόκων σχετίζεται ευθέως ποσοτικά με την έκθεση στον καπνό του τσιγάρου ενώ συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με την ηλικία κατά την έναρξη του καπνίσματος (30). Επιπλέον, για λόγους που δεν έχουν διευκρινισθεί, οι γυναίκες είναι πλέον ευπαθείς στο να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα από τον καπνό του τσιγάρου σε σύγκριση με τους άνδρες για το ίδιο επίπεδο έκθεσης (31). Από τις τρεις μεγάλες κατηγορίες καρκινογόνων που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου (βενζοαπυρένια, νιτροζαμίνες και αρωματικές αμίνες) ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι νιτροζαμίνες επειδή προκαλούν όγκους στον πνεύμονα στα ποντίκια, κυρίως αδενώματα και αδενοκαρκινώματα, ανεξάρτητα από την οδό χορήγησης (29).

Το γεγονός ότι δεν εμφανίζεται καρκίνος του πνεύμονα σε κάθε βαρύ καπνιστή έχει οδηγήσει στην έννοια της ενδοατομικής παραλλαγής και στην υπόθεση ότι τα άτομα εκδηλώνουν γενετικό πολυμορφισμό στους διαύλους μεταβολισμού των καρκινογόνων που καθορίζει τον ατομικό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Η γενετική αυτή ευπάθεια λειτουργεί σε στενή συνάρτηση με το κάπνισμα και άλλους εξωγενείς καρκινογόνους παράγοντες (αλληλοεπίδραση γονιδίων – περιβάλλοντος). Αν και μερικές μελέτες υποδηλώνουν μέτρια συσχέτιση του μηδενικού πολυμορφισμού της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης τάξεως mu (GSTM1) με τον καρκίνο του πνεύμονα (32) η μελέτη μεμονωμένων υποψήφιων γονιδίων δεν είναι αρκετή για να προβλεφθεί ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα εξ αιτίας του πολυσύνθετου του μεταβολισμού των καρκινογόνων, και των αλληλοεπιδράσεων γονιδίων με γονίδια και γονιδίων με το περιβάλλον (29). Σημασία, επίσης, έχει ότι τα άτομα κληρονομούν διάφορο ευπάθεια ως προς το να εθισθούν στη νικοτίνη μέσω πολυμορφισμού σε ένα από του υποδοχείς ντοπαμίνης. Συνολικά, η μοριακή επιδημιολογία υποβοηθούμενη από την τεχνολογία μικροπαρατάξεων του DNA και το πρόγραμμα του ανθρωπίνου γονιδιώματος στο προσεχές μέλλον θα είναι σε θέση να αναγνωρίσει άτομα με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα.

Μοριακές διαταραχές στην προνεοπλασία

Πριν την εμφάνιση κλινικά αναγνωρίσιμου καρκίνου του πνεύμονα παρατηρείται μια σειρά μορφολογικά διακριτών αλλαγών του επιθηλίου των βρόγχων στους καπνιστές (υπερπλασία, μετάπλαση, δυσπλασία, καρκίνωμα *in situ*). Θεωρείται ότι η δυσπλασία και το καρκίνωμα *in situ* αποτελούν αληθείς προκαρκινικές αλλοιώσεις. Οι αλληλοδιάδοχες αυτές αλλοιώσεις έχουν από μακρού αναγνωρισθεί στα επιδερμογενή καρκινώματα που εκκινούν από τους κεντρικούς βρόγχους ενώ πρόσφατα περιεγράφησαν αλλαγές στα περιφερικά βρογχιόλια και τις κυψελίδες όπως αδενοματώδης και κυψελιδική υπερπλασία. Είναι πλέον βέβαιο ότι τα προνεοπλασματικά κύτταρα περιέχουν αρκετές γενετικές ανωμαλίες ταυτόσημες των ανευρισκόμενων στα προφανή καρκινικά κύτταρα. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση επιβεβαίωσε την ανώμαλη έκφραση πρωτοογκογονιδίων (κυκλίνη D1) και των καταπιεστικών του όγκου γονιδίων (p53) στις αλλοιώσεις αυτές (33). Η τυποποίηση των αλληλών σε επακριβώς μικροεκτομηθείσες προνεοπλασματικές εστίες δείχνουν ότι η απώλεια του αλληλού 3p είναι η πρωιμότερη γνωστή αλλαγή, υποδηλώνοντας ότι ένα ή περισσότερα από τα καταπιεστικά του όγκου γονίδια του 3p λειτουργούν σαν θυροφύλακες στην παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα. Η απώλεια αυτή ακολουθείται από απώλεια του αλληλού 9p, απώλεια του αλληλού 8p, και απώλεια του αλληλού 17p (και μετάλλαξη του p53) (34). Ακόμη και το ιστολογικά φυσιολογικό βρογχικό επιθήλιο που γειτονεύει προς τον καρκίνο εμφανίζει γενετικές απώλειες. Παρομοίως, η άτυπη κυψελιδική υπερπλασία που αποτελεί πρόδρομο του αδενοκαρκινώματος βλάβη φιλοξενεί μεταλλάξεις του KRAS (35).

Οι παρατηρήσεις αυτές είναι συμβατές με το πολυπαραγοντικό μοντέλο καρκινογένεσης και την διαδικασία καρκινογένεσης πεδίου δια του οποίου το σύνολο του ιστού εκτίθεται κατ' επανάληψη στην καρκινογενετική βλάβη (καπνός τσιγάρου) και βρίσκεται σε κίνδυνο εμφάνισης πολλαπλών κευωρισμένων εστιών νεοπλασίας. Αν και όλοι οι τύποι καρκίνου του πνεύμονα συνοδεύονται από μοριακές ανωμαλίες στο φυσιολογικό και προνεοπλασματικό πνευμονικό επιθήλιο, οι άρρωστοι με μικροκυτταρικό καρκίνο εμφανίζουν πολλαπλές γενετικές ανωμαλίες στο ιστολογικά φυσιολογικό πνευμονικό επιθήλιο. Παρόμοιες μοριακές βλάβες εμφανίζονται και στους πνεύμονες καπνιστών ή τέως καπνιστών δίχως καρκίνο του πνεύμονα (36, 37). Οι μοριακές αυτές αλλαγές μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά εργαλεία στις προσπάθειες πρώιμης διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα και δείκτες για την προσπάθεια παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της χημειοπροφύλαξης. Με την έννοια αυτή, φαίνεται ότι οι βλαβέντες από το κάπνισμα πνεύμονες περιέχουν χιλιάδες πολλαπλές κλωνικές ή υποκλωνικές συσσωρεύσεις των 90.000 κυττάρων περίπου εκάστη στο αναπνευστικό επιθήλιο που περιέχουν κλώνους κυττάρων με απώλειες στο 3p ή άλλου αλλήλους (38).

Καρκίνος του πνεύμονα και μοριακή βιολογία: εφαρμογές στην καθημερινή κλινική πράξη

Οι γνώσεις μας στην μοριακή γενετική της παθογένειας του καρκίνου του πνεύμονα αυξάνονται ραγδαία. Κάποιες από τις μεταβολές φαίνεται ότι είναι ειδικές για τον καρκίνο του πνεύμονα ενώ άλλες είναι κοινές και σε άλλους καρκίνους. Για τις περιπτώσεις όπου η βιοχημική λειτουργία τους είναι γνωστή οι παθολογικές πρωτεΐνες που παράγονται εμπίπτουν σε ένα από τους ρυθμιστικούς της αύξησης διαύλους. Γίνεται ήδη έντονη προσπάθεια ώστε η γνώση που έχει συσσωρευθεί να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη και οι προσπάθειες αυτές εμπίπτουν σε τέσσερες γενικές κατηγορίες:

α. Αναγνώριση των ατόμων που βρίσκονται στον υψηλότερο κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο του πνεύμονα και θα πρέπει να μπουν σε εντατικό πρόγραμμα διακοπής του καπνίσματος ή/και σε χημειοπροφύλαξη. Με την έννοια αυτή οι θεραπευτικές προσπάθειες των προκαρκινικών βλαβών απαιτείται να έχουν χαμηλή τοξικότητα και υψηλό τηλικό κινδύνου/οφέλους.

β. Ανάπτυξη μεθοδολογίας πρώιμης διάγνωσης για την αναγνώριση πρωτοπαθούς και υποτροπιάζουσας νόσου με την εφαρμογή μεθόδων μοριακής βιολογίας που στηρίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) στα σωματικά υγρά (5, 39). Επειδή μόνο ένας στους δέκα καπνιστές κινδυνεύει να εμφανίσει καρκίνο του πνεύμονα η αναγνώριση των ατόμων που έχουν γενετική προδιάθεση στον καρκίνο του πνεύμονα θα επιτρέψει να επικεντρωθούν σε μικρότερο πληθυσμιακό σύνολο οι συνολικές προσπάθειες για πρώιμη διάγνωση, χημειοπροφύλαξη και διακοπή του καπνίσματος.

γ. Αναγνώριση προγνωστικών βιολογικών δεικτών δυνάμενων να προβλέψουν την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία.

δ. Σχεδιασμός νέων ειδικών αντικαρκινικών θεραπειών με βάση την γνώση των γενετικών ανωμαλιών που συνοδεύουν τα νεοπλασμάτα που περιλαμβάνουν την αντικατάσταση μεταλλαγμένων γονιδίων, την δημιουργία φαρμάκων που στοχεύουν ενεργοποιημένα πρωτοογκογονίδια, την παρενόχληση των αυτοκρινών ή παρακρινών βρόχων, και την αναστολή των διαύλων αγγειογένεσης, μετάστασης και απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα. Αν και αναμένεται ότι οι νέες αυτές θεραπείες μπορεί να χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη αποτελεσματικότητας δεν αναμένεται ότι οι υπάρχουσες θεραπείες θα αντικατασταθούν στις επόμενες δεκαετίες αλλά ότι μάλλον θα συμπληρωθούν.

Βιβλιογραφία

1. Testa JR, Liu Z, Feder M, et al. Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95:20.
2. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643.
3. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378:F21.
4. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11891.
5. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:67.
6. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, et al. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res* 1997; 3:515.
7. Tsai CM, Chang KT, Wu LH, et al. Correlations between intrinsic chemoresistance and HER-2/neu gene expression, p53 gene mutations, and cell proliferation characteristics in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996;56:206.
8. Krystal GW, DeBerry CS, Linnekin D, Litz J. Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1. *Cancer Res* 1998;58:4660.
9. Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, et al. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997;57:433.
10. Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1993;20:105.
11. Bennett WP, Hussain SP, Vahakangas KH, et al. Molecular epidemiology of human cancer risk: gene-environment interactions and p53 mutation spectrum in human lung cancer. *J Pathol* 1999;187:8.

12. Tammemagi MC, McLaughlin JR, Bull SB. Meta-analyses of p53 tumor suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:625.
 13. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hot-spots in P53. *Science* 1996;274:430.
 14. Casey G, Lopez ME, Ramos JC, et al. DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene* 1996;13:1971.
 15. Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, et al. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature Med* 1995;1:701.
 16. Zalcman G, Schlichtholz B, Tredaniel J, et al. Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment. *Clin Cancer Res* 1998;4:1359.
 17. Mitsudomi T, Suzuki S, Yatabe Y, et al. Clinical implications of p53 autoantibodies in the sera of patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1563.
 18. Mishina T, Dosaka-Akita H, Kinoshita I, et al. Cyclin D1 expression in non-small-cell lung cancers: its association with altered p53 expression, cell proliferation and clinical outcome. *Brit J Cancer* 1999;80:1289.
 19. Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, et al. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 1993;8:1913.
 20. Sanders BM, Jay M, Draper GJ, Roberts EM. Non-ocular cancer in relatives of retinoblastoma patients. *Br J Cancer* 1989;60:358.
 21. Albanell J, Lonardo F, Rusch V, et al. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1609.
 22. Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, et al. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:2373.
 23. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nature Med* 1999;5:662.
 24. Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, et al. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 1997;57:1007.
 25. Sulzer MA, Leers MP, van Noord JA, Bollen EC, Theunissen PH. Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1319.
 26. Adachi M, Taki T, Huang C, et al. Reduced integrin alpha3 expression as a factor of poor prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 1998;16:1060.
 27. Shiseki M, Kohno T, Adachi J, et al. Comparative allotype of early and advanced stage non-small cell lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;17:71.
 28. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996;73:931.
 29. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1194.
 30. Wiencke JK, Thurston SW, Kelsey KT, et al. Early age at smoking initiation and tobacco carcinogen DNA damage in the lung. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:614.
 31. Zang EA, Wynder EL. Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:183.
 32. Spivack SD, Fasco MJ, Walker VE, Kaminsky LS. The molecular epidemiology of lung cancer. *Crit Rev Toxicol* 1997;27:319.
 33. Lonardo F, Rusch V, Langenfeld J, Dmitrovsky E, Klimstra DS. Overexpression of cyclins D1 and E is frequent in bronchial preneoplasia and precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 1999;59:2470.
 34. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, et al. Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res* 1999;59:1973.
 35. Westra WH, Baas IO, Hruban RH, et al. K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung. *Cancer Res* 1996;56:2224.
 36. Wistuba II, Lam S, Behrens C, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1366.
 37. Wistuba II, Behrens C, Milchgrub S, et al. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene* 1999; 18:643.
 38. Park IW, Wistuba II, Maitra A, et al. Multiple clonal abnormalities in the bronchial epithelium of patients with lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1863.
 39. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:332.
-